

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年10 月13 日 (13.10.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/094890 A1

(51) 国際特許分類: A61K 45/00, 38/00, 38/22, A61P 19/00, 43/00, C12Q 1/02, G01N 33/15, 33/50 // C07K 14/47, C12N 15/00, 15/09

(71) 出願人 および
(72) 発明者: 中尾 一和 (NAKAO, Kazuwa) [JP/JP]; 〒6101101 京都府京都市西京区大枝北沓掛町4-1-2 Kyoto (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/006837

(22) 国際出願日: 2005 年3 月31 日 (31.03.2005)

(72) 発明者; および

(25) 国際出願の言語: 日本語

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 八十田 明宏 (YASODA, Akihiro) [JP/JP]; 〒6620865 兵庫県西宮市神垣町6-47 Hyogo (JP). 北村 秀智 (KITAMURA, Hidetomo) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP).

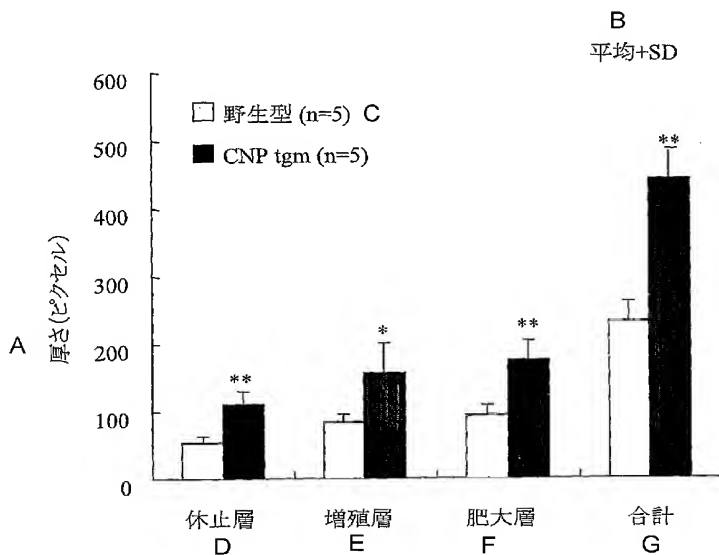
(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2004-107871 2004 年3 月31 日 (31.03.2004) JP

[続葉有]

(54) Title: COMPOSITION FOR INCREASING BODY HEIGHT

(54) 発明の名称: 身長増加用組成物



A THICKNESS (PIXEL)
B MEAN+SD
C WILD TYPE (n=5)
D REST LAYER
E PROLIFERATION LAYER
F THICKENING LAYER
G TOTAL

(57) Abstract: It is intended to provide a composition for increasing the body height of a patient with short stature or an individual other than patients with short stature. More specifically speaking, a composition for increasing the body height containing a guanyl cyclase B (GC-B) activator as the active ingredient which is to be administered to an individual free from FGFR3 failure; a method for increasing the body height of an individual free from FGFR3 failure which comprises activating GC-B; a method of screening an agent for increasing the body height which comprises selecting an agent for increasing the body height with the use of the GC-B activity as an indication; and a method of elongating a cartilaginous bone free from FGFR3 failure which comprises activating GC-B.

(57) 要約: 本発明は、低身長症患者又は低身長症患者以外の個体において身長を増加させるための組成物を提供する。具体的には、本発明は、グアニルシクラーゼB (GC-B) 活性化物質を有効成分として含む、FGFR3異常を有しない個体に投与する身長増加用組成物、GC-Bを活性化することに

よって、FGFR3異常を有しない個体の身長を増加するための方法、GC-Bの活性を指標として身長増加剤を選択することを含む身長増加剤のスクリーニング方法、並

[続葉有]

WO 2005/094890 A1



(74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門4丁目3番20号 神谷町MTビル19階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

身長増加用組成物

技術分野

本発明は、グアニルシクラーゼ B (GC-B) を活性化する物質を有効成分として含む身長増加用組成物に関する。具体的には、本発明の組成物は、FGFR3 異常を有しない、低身長症患者に対する治療用途又は低身長症患者以外の個体での伸長用途に使用しうる。

本発明はまた、GC-B を活性化することによる身長増加方法に関する。

本発明はさらに、GC-B の活性を指標とした身長増加剤のスクリーニング方法に関する。本発明はさらに GC-B を活性化することにより FGFR3 異常を有しない軟骨性骨を伸長させる方法に関する。

発明の背景

医学的な低身長症とは、「同性、同年齢の身長の平均値より $-2SD$ (SD : 標準偏差) 以下」と定義され、この基準に該当する場合に低身長症として診断されている。そして低身長症には、成長ホルモンやインシュリン様成長因子-I (IGF-I) 分泌不全などに伴う内分泌性低身長症と、家族性低身長、胎内発育不全性低身長、染色体異常などの非内分泌性低身長症、さらに薬物治療や放射線療法による二次性低身長症に大別される。

従来、低身長症の治療として成長ホルモンの投与や、股関節の人工関節置換や脚延長術などの整形外科手術が行われてきた。脚延長術は、10 歳以降に骨を切つて特殊な機械 (脚延長器) により、半年くらいかけて徐々に身長を伸ばすが、この手術は患者に大きな苦痛を与える。また成長ホルモン療法は幼児期からの定期的な成長ホルモン注射により身長の伸びは改善するが、注射を止めると伸びは止まってしまう。これらのいずれの治療法も病気を治すものではなく、患者の QOL の観点からも理想的ではないと考えられている (American Journal of Medical Genetics 1997; 72: 71-76) ; European Journal of Endocrinology 1998; 138:

275-280(非特許文献 2))。低身長症のうち内分泌性低身長症は遺伝子組み替え成長ホルモンや IGF-I などの薬剤での治療が可能な疾患であるが、非内分泌性低身長症である家族性低身長症、胎内発育不全性低身長症の原因は明らかではなく、成長ホルモンは非内分泌性低身長症には効果が認められていないことから、有効な治療薬は存在しなかった(メルクマニュアル第 17 版 1999 年 日経 B P 社/日経 B P 出版センター)。これらの状況から新しい機序に基づく治療薬の開発が望まれてきた。

グアニルシクラーゼ (GC) は、GTP からセカンドメッセンジャーである cGMP の合成を触媒する酵素ファミリーに属する膜蛋白質であり、GC-A, GC-B, ..., GC-F が知られている。GC-B は主に血管内皮細胞に見出され、平滑筋の弛緩に関与すると考えられている。

ナトリウム利尿ペプチド (NP) 類は、ANP (心房性ナトリウムペプチド)、BNP (脳性ナトリウム利尿ペプチド) および CNP (C 型ナトリウム利尿ペプチド) の 3 種類からなり、2 種類のグアニルシクラーゼ共役受容体 (ANP および BNP に対する NPR-A、CNP に対する NPR-B) を介して細胞内 cGMP 濃度を上昇させ、さらに複数の cGMP エフェクター分子の仲介によって細胞内シグナル伝達が行われると考えられている (Ann Rev Biochem 1991;60: 229-255)。NP 類は、体液の恒常性の制御や血圧の調節に重要な役割を果たすと報告されているが (J Clin Invest 1987;93:1911-1921, J Clin Invest 1994; 87: 1402-1412)、心臓血管系以外の様々な組織での発現とその生理活性も知られている (Endocrinol 1991;129:1104-1106, Ann Rev Biochem 1991;60: 553-575)。軟骨に関しては、BNP (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1998;95:2337-2342) または CNP の関節部位における過剰発現が、繊維芽細胞増殖因子レセプター 3 (FGFR3) 遺伝子の変異に起因する軟骨無形成症の治療に有効であることが報告されている (Nat Med 2004;10(1):80-86 ; 特開 2003-113116 公報)。

本発明の目的は、FGFR3 異常を有しない、低身長症患者又は低身長症患者以外の個体において治療又は美容等のために身長を増加させるための組成物を提供することである。

本発明の別の目的は、GC-B を活性化することにより、FGFR3 異常を有しない、

低身長症患者又は低身長症患者以外の個体の身長を増加させる方法を提供することである。

本発明のさらに別の目的は、GC-B の活性を指標として身長増加剤をスクリーニングする方法を提供することである。

本発明のさらに別の目的は GC-B を活性化することにより FGFR3 異常を有しない軟骨性骨を伸長させる方法に関することである。

発明の概要

本発明者らは、グアニルシクラーゼ B (GC-B) 活性化物質の 1 種である C 型ナトリウム利尿性ペプチド (CNP) が全身で発現し、血中濃度が上昇する CNP トランスジェニックマウスを作製し、身長への影響および成長軟骨への影響を検証した結果、CNP トランスジェニックマウスでは、身長増加が促進されていることおよび大腿骨成長軟骨が有意に肥厚していること、また、これらの CNP トランスジェニックマウスの性状解析から、FGFR3 異常を有しない場合において CNP が血行性に作用することで身長増加が促進されることを見出した。

したがって、本発明は、下記の発明からなる。

本発明は、第 1 の態様において、GC-B を活性化する物質を有効成分として含む、FGFR3 異常を有しない個体に投与する身長増加用組成物を提供する。

本発明の一の実施態様において、上記組成物が FGFR3 異常を有しない低身長症患者に使用される。

本発明の別の実施態様において、上記組成物が FGFR3 異常を有しない低身長症患者以外の個体に使用される。

本発明の別の実施態様において、上記身長増加が軟骨性骨の伸長である。

本発明の別の実施態様において、上記身長増加が大腿骨、脛骨、橈骨及び/又は尺骨の伸長である。

本発明の別の実施態様において、上記物質がペプチドである。

本発明の別の実施態様において、上記ペプチドが CNP 又はその誘導体である。

本発明の別の実施態様において、上記 CNP が、ヒトを含む哺乳類又は鳥類由来の CNP-22 及び CNP-53 から選択される。

本発明の別の実施態様において、上記 CNP が配列番号 1 の CNP-22 又は配列番号 2 の CNP-53 である。

本発明の別の実施態様において、上記誘導体が、配列番号 1 又は配列番号 2 のアミノ酸配列において 1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加しかつ CNP 活性を有するものである。

本発明は、第 2 の態様において、GC-B を活性化することによって、FGFR3 異常を有しない個体の身長を増加することを特徴とする、身長増加方法を提供する。

本発明の一の実施態様において、上記身長増加が軟骨性骨の伸長である。

本発明の別の実施態様において、上記身長増加が大腿骨、脛骨、橈骨及び/又は尺骨の伸長である。

本発明の別の実施態様において、上記 GC-B が、CNP 又はその誘導体によって活性化される。

本発明の別の実施態様において、上記 CNP が、ヒトを含む哺乳類又は鳥類由来の CNP-22 又は CNP-53 である。

本発明の別の実施態様において、上記 CNP が、配列番号 1 の CNP-22 又は配列番号 2 の CNP-53 である。

本発明の別の実施態様において、上記誘導体が、配列番号 1 又は配列番号 2 のアミノ酸配列において 1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加しかつ CNP 活性を有するものである。

本発明は、第 3 の態様において、GC-B の活性を指標として身長増加剤の候補薬剤をスクリーニングすることを含む、身長増加剤のスクリーニング方法を提供する。

本発明の一の実施態様において、上記 GC-B の活性が、細胞内 c GMP 産生量として測定される。

本発明の別の実施態様において、上記方法が、ヒト GC-B を強制発現させた培養細胞株を準備し、該細胞株を被験物質の存在下又は非存在下で培養し、該細胞株の細胞内 c GMP の産生量を測定し、該被験物質の存在下と非存在化での細胞内 c GMP 産生量の差を指標として身長増加剤の候補薬剤をスクリーニングすることを含む。

本発明はさらに、GC-B を活性化することにより FGFR3 異常を有しない軟骨性骨を伸長させる方法を提供する。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2004-107871 号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図 1 は、CNP トランスジェニックマウス作製用ベクターの構築を示す。図 1A : pGEM-T Easy ベクターに組み込まれたマウス CNP の cDNA を PstI で切り出し両末端を平滑化した。図 1B : pSG1 を Eco RI で処理して断端を平滑化した。図 1C : 図 1A で得られたマウス CNP の cDNA を図 1B で得られた pSG1 に組み込んだ。

図 2 は、インジェクション用 DNA フラグメントを示す。図 1C の pSG1-CNP から、HindIII および XhoI で処理した後、CNP 遺伝子を含む断片(約 2.3kb)を切り出し、インジェクション用のフラグメントとした。

図 3 は、CNP トランスジェニックマウスの遺伝子型解析結果を示す。野生型マウス (WT) では 3 本のシグナル (野生型 CNP 遺伝子) が検出され、トランスジェニックマウス (Tgm) では野生型 CNP 遺伝子に加えて、導入遺伝子由来のシグナル (トランスジーン) が 2 本検出された

図 4 は、CNP トランスジェニックマウスの成長曲線の推移を示す。雌の CNP トランスジェニックマウス (TG) は、2 週齢以降継続して正常同腹仔 (WT) に対して有意に鼻肛長が長かった (図 4A)。雄では、4 週齢以降継続して正常同腹仔 (WT) に対して有意に鼻肛長が長かった (図 4B)。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ vs. WT, 対応のない Student t 検定。

図 5 は、CNP トランスジェニックマウスの大腿骨成長軟骨の肥厚を示す。CNP トランスジェニックマウス (CNP tgm) は、休止層 (Resting)、増殖層 (Proliferating)、肥大層 (Hypertrophy) およびこれらの合計 (Total) のすべてについて正常同腹仔 (Wild) に対して有意に厚かった。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ vs. 野生型, 対応のない Student t 検定。

発明の詳細な説明

図面を参照しながら、本発明をさらに具体的に説明する。

本発明者らが後述の実施例 2 に記載のように作製した CNP-トランスジェニックマウス (CNPTgm) についてサザンブロット法を用いて遺伝子型解析を行ったところ、図 3 に示されるように、野生型マウスでは 3 本のシグナル (野生型 CNP 遺伝子) が検出され、CNPTgm では野生型 CNP 遺伝子に加えて、導入遺伝子由来の 2 本のシグナル (トランスジーン) が検出された。CNPTgm での CNP の発現を検討するため、導入した遺伝子の高発現が予想される臓器である肝臓および血漿での CNP の濃度を調べたところ、CNP Tgm は野生型に対し、肝臓で約 10 倍、血漿で約 24 倍の CNP 濃度を示しており、統計学的に有意に CNP ペプチドが過剰発現されていることが確認された (実施例 4 の表 1)。

さらに雌雄の CNPTgm およびその正常同腹仔の鼻肛長を、2~9 週間にわたり経時的に測定した結果、雌雄ともに CNPTgm は鼻肛長が正常同腹仔よりも大きく、身長が増加していることが判明した (図 4 ; A : 雌、B : 雄)。従って血中の CNP 濃度を上昇させることで身長増加が促進されることが確認された。

CNPTgm の成長軟骨の厚さを組織学的に解析する目的で、大腿骨膝蓋面の成長軟骨の休止層、増殖層、肥大層の厚さの平均値および成長軟骨の厚さとして前記 3 層の合計値を用いて解析を行ったところ、CNPTgm においては、休止層、増殖層、肥大層およびその合計のすべてについて統計学的に有意に厚いことが確認された (図 5)。CNP は、大腿骨の軟骨性骨以外にも、例えば脛骨、橈骨、尺骨等の他の軟骨性骨の休止層、増殖層、肥大層各層を厚くすることによっても動物の身長増加を促進することが示された。

従って、本発明は、GC-B を活性化する物質を有効成分として含む、FGFR3 異常を有しない個体に投与する身長増加用組成物を提供する。

本発明において、「FGFR3 異常」とは、FGFR3 (繊維芽細胞増殖因子レセプター 3) 遺伝子の変異による軟骨の成長抑制に起因する軟骨無形成症及び軟骨形成不全症や、FGFR3 遺伝子の変異による FGFR3 の機能亢進を含み、さらには FGFR3 の機能抑制不全、又は FGFR3 遺伝子の発現亢進などを原因とする軟骨無形成症及び軟骨形成不全症を意味する (特開 2003-113116、Nat Med 2004, 10(1):80-86、国際公開 W002/074234)。

本発明の実施態様において、上記組成物は FGFR3 異常を有しない低身長症患者に使用される。本発明において「低身長症」として、FGFR3 異常を除いた低身長症をいい、例えば(1)成長ホルモン分泌不全性低身長症（下垂体性小人症）、甲状腺機能低下症、副腎皮質機能亢進症等による内分泌性低身長症、(2)家族性低身長、胎内発育不全性低身長、染色体異常（ターナー症候群、プラダー・ヴィリ症候群など）などによる非内分泌性低身長症、並びに(3)薬物治療や放射線療法による二次性低身長症を包含する。

本発明の別の実施態様において、上記組成物はさらに FGFR3 異常を有しない、低身長症患者以外の個体にも使用されうる。本発明において、FGFR3 異常を有しない低身長症患者以外の個体での使用又は伸長用途としては、美容医療分野及びスポーツ分野、さらには身長増加を望むヒトでの使用を包含する。

本発明で使用を意図する個体は、ヒトを含む哺乳動物、例えばヒト、ブタ、ウシなどを含むが、これらの特定例によって制限されない。好ましい個体は、ヒトである。

本発明の別の実施態様において、上記身長増加は軟骨性骨の伸長である。

本発明のさらに別の実施態様において、上記身長増加は大腿骨、脛骨、橈骨及び/又は尺骨の伸長である。

本発明においてグアニルシクラーゼ B (GC-B) とは、ナトリウム利尿ペプチド受容体 B (NPR-B) と同義の用語として使用する。

本発明において GC-B 活性とは、グアニルシクラーゼ活性と同義の用語として使用する。

本発明において、グアニルシクラーゼ B (GC-B) 活性化物質又は GC-B 活性化物質は、CNP の受容体として知られる GC-B と結合してこれを活性化するペプチド又は非ペプチド性低分子化合物であり、好ましくは CNP ペプチド又はその誘導体である。ここでペプチドは、複数の（L-、D-及び/又は修飾）アミノ酸のアミド結合連鎖からなる物質を指し、この中にはポリペプチド及び蛋白質も包含される。GC-B 活性化物質は、例えば、COS-7 等の培養細胞株に GC-B 受容体を発現させ、培地に候補薬剤を添加し、一定の温度及び一定の時間（例えば 37℃、5 分間）細胞株を培養したのち、細胞内の c GMP 産生量を測定する方法 (Science 1991; 252: 120-123)

によって同定されうる。すなわち、このようなアッセイ系を使用して細胞内 c GMP の産生量を指標として GC-B 活性化物質を同定し、それを本発明に使用することができる。

本発明の実施態様において、GC-B 活性化物質はペプチドであり、好ましくは CNP 又はその誘導体である。好ましい CNP は、ヒトを含む哺乳類又は鳥類由来の CNP-22 及び CNP-53 から選択されるものであり、さらに好ましくは、配列番号 1 の CNP-22 又は配列番号 2 の CNP-53 である。

本発明の別の実施態様において、上記 CNP 誘導体は、配列番号 1 又は配列番号 2 のアミノ酸配列において 1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加しかつ CNP 活性を有するものである。あるいは、上記 CNP 誘導体は、配列番号 1 又は配列番号 2 のアミノ酸配列と約 70%以上、約 80%以上、約 85%以上、約 90%以上、約 95%以上、約 97%以上、約 98%以上、約 99%以上の%同一性を有する配列を含みかつ CNP 活性を有するものである。

本明細書中で使用される「1～数個」という用語は、通常 1～10、好ましくは 1～5、さらに好ましくは 1～3 の任意の整数を表す。また、2つのアミノ酸配列間の「%同一性」は、当業者に公知の BLAST タンパク質検索などの手法を用いて決定することができる (Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) “Basic Local Alignment Search Tool” J. Mol. Biol. 215:403-410)。

本発明で使用可能な CNP には、ヒトを含む哺乳類由来 CNP (CNP-22: Biochem. Biophys. Res. Commun. 1990; 168: 863-870, 国際公開 W091/16342、CNP-53: Biochem. Biophys. Res. Commun. 1990; 170: 973-979, 特開平 4-74198 号公報、特開平 4-139199 号公報、特開平 4-121190 号公報)、鳥類由来 CNP (特開平 4-120094 号公報)、両生類由来 CNP (特開平 4-120095 号公報)、並びに、特開平 6-9688 号公報、国際公開 W002/074234 に開示される CNP 類似体ペプチドのような CNP 誘導体が含まれる。

天然由来 CNP として、22 及び 53 アミノ残基からなる CNP-22 及び CNP-53 が知られており、鳥類及びヒトを含む哺乳類由来の各 CNP を比較すると種を超えて配列相同が高いため、本発明においては、鳥類又はヒトを含む哺乳類由来の CNP、

好ましくはヒトを含む哺乳類由来の CNP、さらに好ましくはヒト由来の CNP が使用されうる。ヒト CNP-22 及び CNP-53 のアミノ酸配列は、下記の配列番号 1 及び配列番号 2 :

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys (ヒト CNP-22:配列番号 1) ;

Asp Leu Arg Val Asp Thr Lys Ser Arg Ala Ala Trp Ala Arg Leu Leu Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys (ヒト CNP-53:配列番号 2)

として示される配列を有しており、いずれも分子内ジスルフィド結合を有し、すなわちヒト CNP-22 では 6 位のシステイン残基と 22 位のシステイン残基との間で、またヒト CNP-53 では 37 位のシステイン残基と 53 位のシステイン残基との間でそれぞれ分子内ジスルフィド結合を有し、環状ペプチド構造を形成している。

ブタ CNP-22 及びラット CNP-22 は、ヒト CNP-22 と同一のアミノ酸配列を有するが、一方、ブタ CNP-53 及びラット CNP-53 では 17 位及び 28 位のアミノ酸残基がそれぞれ His 及び Gly であるのに対しヒト CNP-53 ではそれぞれ Gln 及び Ala であり、2 つのアミノ酸が相違する (特開平 4-139199 号公報、特開平 4-121190 号公報、特開平 4-74198 号公報)。さらにまた、ニワトリ CNP-22 は、9 位のアミノ酸残基 Val のみがヒト CNP-22 と異なる以外は同じ一次構造を有している (特開 4-120094 号公報)。

本発明で使用する上記 CNP は、天然からの精製 CNP、既知の遺伝子工学的手法で製造された遺伝子組換え CNP、既知の化学合成法 (例えばペプチド合成機を用いる固相合成法) で製造された CNP を含み、好ましくは遺伝子工学的手法で製造されたヒト CNP-22 およびヒト CNP-53 である。遺伝子工学的手法によるヒト CNP の製造は、例えば、ヒト CNP-22 又は CNP-53 の DNA 配列 (特開平 4-139199 号公報) をプラスミド、ファージなどのベクターに組み込み、大腸菌や酵母などの原核もしくは真核生物宿主細胞に形質転換したのち、適する培地中で発現し、好ましくは細胞外に CNP ペプチドを分泌させ、産生した CNP ペプチドを回収し精製する各工程を含む。また、目的 DNA の増幅のために、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 技術

を使用することができる。

遺伝子組換え技術、部位特異的突然変異誘発法、PCR 技術などの基本的な手法は当業者には公知であり、例えば J. Sambrook ら, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1990); Ausubel ら, Current Protocols In Molecular Biology, John Wiley & Sons (1998) などに記載されており、そこに開示される技術を本発明のために利用することができる。またベクターとしては、市販のベクターあるいは刊行物記載のベクターが使用できる。

本発明で使用する CNP 誘導体は、CNP 活性を有するとともに、ヒト CNP-22 又は CNP-53 と同一の 2 つのシステイン残基間のジスルフィド結合による環状ペプチド構造を有するものであって、上記 CNP のフラグメント、上記 CNP 又はそのフラグメントの構成アミノ酸の少なくとも 1 つをその他のアミノ酸に置換したペプチド、上記 CNP そのもの又はその部分ペプチドの構成アミノ酸の少なくとも 1 つを欠失したペプチド、及び上記 CNP そのもの又はその部分ペプチドの構成アミノ酸に 1 つ以上のアミノ酸を付加したペプチドを含む。アミノ酸の置換、欠失、付加とは、CNP 活性を損なわない限り、部位特異的突然変異誘発法などの周知の方法にてアミノ酸の置換、欠失又は付加できる程度の数のアミノ酸が置換、欠失又は付加されることを意味する。このような CNP-22 又は CNP-53 の誘導体は例えば、配列番号 1 又は配列番号 2 のアミノ酸配列において 1 ～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加しかつ CNP 活性を有するものである。

アミノ酸の置換については、一般的に保存的アミノ酸置換が好ましい。保存的アミノ酸は、例えば極性度（または疎水性度）や電荷の種類によって分類されることができる。例えば、非極性の非電荷型アミノ酸にはグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリンなど、芳香族アミノ酸にはフェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、極性の非電荷型アミノ酸にはセリン、トレオニン、システイン、メチオニン、アスパラギン、グルタミンなど、負電荷アミノ酸にはアスパラギン酸、グルタミン酸、正電荷アミノ酸にはリジン、アルギニン、ヒスチジンが、それぞれ含まれる。

本明細書中で使用される「CNP 活性」とは、GC-B に作用してグアニルシクラー

ゼ活性を上昇させる活性あるいは身長を有意に増加させる活性をいう。CNP 活性は、細胞のグアニルシクラーゼ活性、たとえば細胞内 c GMP の産生量を測定することによること、あるいはマウス、ラットなどの動物に一定期間 GC-B 活性化物質を投与したのち、後述の実施例 5 に記載されるように鼻肛長を測定すること、によって決定しうる。

CNP-22 類似ペプチドには、例えば特開平 6-9688 号公報や国際公開 W002/074234 に記載されるような下記の環状ペプチドが含まれる（なお、配列中の下線はヒト CNP-22 からの変異を表す）。

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ala Met Ser Gly
Leu Gly Cys (配列番号 3)

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Gln Ser Gly
Leu Gly Cys (配列番号 4)

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Ala Ser Gly
Leu Gly Cys (配列番号 5)

Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys (配列
番号 6)

Ser Leu Arg Arg Ser Ser Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser
Gly Leu Gly Cys (配列番号 7)

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly
Leu Gly Cys Asn Ser Phe Arg Tyr (配列番号 8)

Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Gln Ser Gly Leu Gly Cys Asn Ser
Phe Arg Tyr (配列番号 9)

Cys Phe Gly Xaa Xbb Xcc Asp Arg Ile Gly Xdd Xee Ser Xff Xgg Gly Cys

（ここで、Xaa=Leu, Ile, Val; Xbb=Lys, Leu, Met; Xcc=Leu, Ile, Ala, Val;
Xdd=Ser, Ala, Gly, Thr, Asn; Xee=Met, Ala, Trp, His, Lys, Ser, Gly; Xff=Gly,
Lys, Ala, Leu; Xgg=Leu, Met である。）（配列番号 10）

また、CNP-53 類似ペプチドには、上記の CNP-22 類似ペプチドに対応するアミノ酸の同様の変異を含む環状ペプチドが含まれる。

本発明はまた、GC-B を活性化することによって、FGFR3 異常を有しない個体の

身長を増加することを特徴とする、身長増加方法を提供する。この発明は、GC-B 活性化物質が、FGFR3 異常を有しない個体の身長を増加するという知見に基づくものである。具体的には、上記身長増加は軟骨性骨の伸長であり、さらに具体的には、大腿骨、脛骨、橈骨及び/又は尺骨の伸長である。GC-B 活性化物質の具体例は、上記定義の CNP 又はその誘導体である。CNP は、好ましくは、ヒトを含む哺乳類又は鳥類由来の CNP-22 又は CNP-53 であり、さらに好ましくは、配列番号 1 の CNP-22 又は配列番号 2 の CNP-53 である。また、CNP 誘導体は、配列番号 1 又は配列番号 2 のアミノ酸配列において 1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加しかつ CNP 活性を有するものを含む。他の GC-B 活性化物質は、例えば、COS-7 等の培養細胞株に GC-B 受容体を発現させ、培地に候補薬剤を添加し、一定の温度及び一定の時間(例えば 37℃、5 分間)細胞株を培養したのち、細胞内の c GMP 産生量を測定する方法(Science 1991; 252: 120-123)によって同定されうる。すなわち、このようなアッセイ系を使用して細胞内 c GMP の産生量を指標として GC-B 活性化物質を同定し、それを本発明に使用することができる。

本発明はさらに、GC-B の活性を指標として身長増加剤の候補薬剤をスクリーニングすることを含む、身長増加剤のスクリーニング方法を提供する。本発明の実施態様により、GC-B は、上記定義の CNP 又はその誘導体によって活性化されうる。GC-B は、グアニルシクラーゼ活性により GTP からセカンドメッセンジャーである c GMP の合成を触媒することが知られているので、GC-B の活性は、細胞内 c GMP 産生量として測定されうる。

本発明の実施態様において、上記スクリーニング方法は GC-B を発現する培養細胞又は関節軟骨細胞由来の細胞を準備し、該細胞を候補薬剤の存在下で培養し、該細胞の GC-B 活性を指標として身長増加剤の候補薬剤をスクリーニングすることからなる方法を含む。

本発明の実施態様において好ましくは、GC-B を強制発現させた培養細胞株を準備し、該細胞株を候補薬剤の存在下又は非存在下で培養し、該細胞株の細胞内 c GMP の産生量を測定し、候補薬剤の存在下と非存在化での細胞内 c GMP 産生量の差を指標として身長増加について候補薬剤をスクリーニングすることからなる方法を含む。

本発明のスクリーニング方法は、例えば、COS-7 等の培養細胞株に GC-B 受容体を発現させ、培地に被験物質を添加し、一定の温度及び一定の時間（例えば 37℃、5 分間）細胞株を培養したのち、細胞内の c GMP 産生量を測定する方法（Science 1991； 252： 120-123）によって身長増加剤をスクリーニングすることができる。

本発明はさらに GC-B を活性化することにより FGFR3 異常を有しない軟骨性骨を伸長させる方法を提供する。本発明の実施態様においては、GC-B を活性化することにより *in vivo*、*ex vivo* あるいは *in vitro* にて軟骨性骨の伸長を促進することができる。本発明の実施態様においては好ましくは培養骨、培養軟骨の培養時において GC-B を活性化する物質を添加することにより FGFR3 異常を有しない軟骨性骨の伸長を促進する方法を含む。

本発明の組成物は、有効成分としての上記定義の GC-B 活性化物質を、製薬上許容可能な担体、賦形剤、添加剤などと組み合わせて、経口投与用又は非経口投与用に製剤化される。

本発明の組成物は、上記定義の GC-B 活性化物質を有効成分として含み、さらに通常の製剤化の際に用いられる担体や賦形剤、その他の添加剤を用いて調製される。

製剤用の担体や賦形剤としては、例えば、乳糖、ステアリン酸マグネシウム、デンプン、タルク、ゼラチン、寒天、ペクチン、アラビアゴム、オリーブ油、ゴマ油、カカオバター、エチレングリコールなどやその他常用されるものをあげることができる。

経口投与のための固体組成物としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤などが用いられる。このような固体組成物においては、少なくともひとつの有効成分が少なくともひとつの不活性な希釈剤、例えば、乳糖、マンニトール、ブドウ糖、ヒドロキシプロピルセルロース、微結晶性セルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウムなどと混合される。組成物は、常法にしたがって不活性な希釈剤以外の添加物、例えば、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、繊維素グリコール酸カルシウムのような崩壊剤、グルタミン酸又はアスパラギン酸のような溶解補助剤を含んでいてもよい。錠剤又は丸剤は、必要によりショ糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース

フタレートなどの糖衣や胃溶性又は腸溶性物質のフィルムで被覆してもよいし、2つ以上の層で被覆してもよい。さらに、ゼラチンのような吸収されうる物質のカプセルも含まれる。

経口投与のための液体組成物は、薬剂的に許容される乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、エリキシル剤などを含み、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば精製水、エタノールなどを含んでいてもよい。この組成物は、不活性な希釈剤以外に湿潤剤、懸濁剤のような補助剤、甘味剤、風味剤、芳香剤、防腐剤などを含んでいてもよい。

非経口投与のための注射剤としては、無菌の水性又は非水性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤が含まれる。水性の溶液剤、懸濁剤としては、例えば、注射用水及び注射用生理食塩液が含まれる。非水性の溶液剤、懸濁剤としては、例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類、ポリソルベート 80（登録商標）などが含まれる。このような組成物は、さらに防腐剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤（例えば、乳糖）、溶解補助剤（例えば、グルタミン酸、アスパラギン酸）のような補助剤を含んでいてもよい。これらは、例えば、精密ろ過膜によるろ過滅菌、高圧蒸気滅菌のような加熱滅菌、あるいは、殺菌剤の配合などの通常の滅菌方法によって無菌化することが可能である。注射剤は溶液製剤であっても、使用前に溶解再構成するために凍結乾燥したものであってもよい。凍結乾燥のための賦形剤としては例えばマンニトール、ブドウ糖などの糖アルコールや糖類を使用することが出来る。

本発明の治療剤又は予防剤は、医薬に一般に使用されている経口投与方法又は非経口投与方法のいずれかによって投与される。好ましくは非経口投与方法、例えば注射による投与（皮下注射、静脈注射、筋肉注射、腹腔内への注射などによる投与）、経皮投与、経粘膜投与（経鼻投与、経直腸投与など）、経肺投与などであるが、経口投与方法による投与も可能である。

本発明の製剤中に含まれる有効成分である GC-B 活性化物質、好ましくは上記定義の CNP 又はその誘導体、の量は、治療すべき疾患の種類、疾患の重症度、患者の年齢などに応じて決定できるが、一般に $0.005 \mu\text{g/kg} \sim 100\text{mg/kg}$ の範囲で投与

することができるが、 $0.02 \mu\text{g/kg}$ ～ 5mg/kg で投与することが好ましい。しかしながら本発明の GC-B 活性化物質を含有する医薬剤はこれらの投与量に制限されるものではない。

本発明として以下の事項を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

(1) GC-B 活性化物質を有効成分として含む、FGFR3 異常を有しない個体に投与する身長増加用組成物。

(2) 低身長症患者に使用される、上記(1)に記載の組成物。

(3) 低身長症患者以外の個体に使用される、上記(1)に記載の組成物。

(4) 上記身長増加が軟骨性骨の伸長である、上記(1)～(3)のいずれかに記載の組成物。

(5) 上記身長増加が大腿骨、脛骨、橈骨及び/又は尺骨の伸長である、上記(1)～(4)のいずれかに記載の組成物。

(6) 上記物質がペプチドである、上記(1)～(5)のいずれかに記載の組成物。

(7) 上記ペプチドが CNP 又はその誘導体である、上記(6)に記載の組成物。

(8) 上記 CNP が、ヒトを含む哺乳類又は鳥類由来の CNP-22 及び CNP-53 から選択される、上記(7)に記載の組成物。

(9) 上記 CNP が配列番号 1 の CNP-22 又は配列番号 2 の CNP-53 である、上記(7)に記載の組成物。

(10) 上記誘導体が、配列番号 1 又は配列番号 2 のアミノ酸配列において 1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加しかつ CNP 活性を有するものである、上記(7)に記載の組成物。

(11) GC-B を活性化することによって、FGFR3 異常を有しない個体の身長を増加することを特徴とする、身長増加方法。

(12) 上記身長増加が軟骨性骨の伸長である、上記(11)に記載の身長増加方法。

(13) 上記身長増加が大腿骨、脛骨、橈骨及び/又は尺骨の伸長である、上記(11)又は(12)に記載の身長増加方法。

(14) 上記 GC-B が、CNP 又はその誘導体によって活性化される、上記(11)～(13)のいずれかに記載の身長増加方法。

(15) 上記 CNP が、ヒトを含む哺乳類又は鳥類由来の CNP-22 又は CNP-53 である、上記 (14) に記載の身長増加方法。

(16) 上記 CNP が、配列番号 1 の CNP-22 又は配列番号 2 の CNP-53 である、上記 (14) に記載の身長増加方法。

(17) 上記誘導体が、配列番号 1 又は配列番号 2 のアミノ酸配列において 1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加しかつ CNP 活性を有するものである、(14) に記載の身長増加方法。

(18) GC-B の活性を指標として身長増加剤の候補薬剤をスクリーニングすることを含む、身長増加剤のスクリーニング方法。

(19) GC-B を発現する培養細胞又は関節軟骨細胞由来の細胞を準備し、該細胞を候補薬剤の存在下で培養し、該細胞の GC-B 活性を指標として身長増加剤の候補薬剤をスクリーニングすることを含む、(18) に記載のスクリーニング方法。

(20) 上記 GC-B の活性が、細胞内 c GMP 産生量として測定される、上記 (18) 又は (19) に記載のスクリーニング方法。

(21) GC-B を強制発現させた培養細胞株を準備し、該細胞株を被験物質の存在下又は非存在下で培養し、該細胞株の細胞内 c GMP の産生量を測定し、該被験物質の存在下と非存在化での細胞内 c GMP 産生量の差を指標として身長増加剤の候補薬剤をスクリーニングすることを含む、上記 (18) ～ (20) に記載のスクリーニング方法。

(22) GC-B を活性化することにより FGFR3 異常を有しない軟骨性骨を伸長させる方法。

以下の実施例によって本発明を更に詳細に説明するが、これらの実施例は単に例示を目的としたものであって、本発明を制限するものではない。それゆえ、本発明は、これらの実施例によって制限されないものとする。

実施例 1

CNP トランスジェニックマウス作製用ベクターの構築

図 1 A に示すように、pGEM-T easy vector (Promega 社製) にマウス CNP cDNA (526 bp; FEBS Lett. 276:209-213, 1990) をサブクローニングさせたものを Pst I で切

断し、断端を平滑化してマウス CNP cDNA を調製した。pSG I ベクター (Promega 社製; 図 1 B) を Eco RI で切断し断端を平滑化して、図 1 C のようにマウス CNP cDNA を ligation し、SAP-mCNP ベクター (pSG1-CNP) を作製した。

実施例 2

CNP トランスジェニックマウスの作製

インジェクション用 DNA フラグメントは、次のようにして調製した。まず CNP 遺伝子を挿入した SAP-mCNP ベクター (pSG1-CNP ; 図 1C) を、HindIII および XhoI で処理した後、CNP 遺伝子を含む断片 (約 2.3kb) を切り出した。この断片を、Gel Extraction Kit (QIAGEN) により回収し、 $3 \text{ ng}/\mu\text{l}$ になるように PBS⁻ で希釈してインジェクション用 DNA フラグメント (図 2) とした。

DNA フラグメントを注入するマウス前核期卵は、次のようにして回収した。すなわち、まず C57BL/6 雌マウス (日本クレア) に 5 i.u の妊馬血清性性腺刺激ホルモン (PMSG) を腹腔内投与、さらに 48 時間後 5 i.u のヒト絨毛ゴナドトロピン (hCG) を腹腔内投与することによって、過排卵処理した。この雌マウスを同系統の雄マウスと交配させた。交配の翌朝、プラグを確認したマウスの卵管を灌流してマウス前核期卵を回収した。

インジェクション用 DNA フラグメントは、マイクロマニピュレーターを用いて前核期卵へ注入した (ジーンターゲティングの最新技術 (羊土社), 190-207, 2000)。DNA フラグメントを 660 個の C57BL/6J 胚へ注入し、翌日、2 細胞期に発生していた胚 561 個を、偽妊娠 1 日目の受容雌の卵管に片側当たり 10 個前後 (1 匹あたり 20 個前後) を移植した。

分娩予定日に至っても産仔を娩出しなかった受容雌については、帝王切開を施し里親に哺育させた。136 例の産仔が得られ、そのうちの 5 例が CNP 遺伝子が導入されたトランスジェニックマウス (以下、Tgm と記載する) であった。以下、最初に得られたマウスを Founder と記載する。

Founder は全て雄マウスで、これら 5 ラインの内 4 ラインから、次世代 (F1 マウス) の産仔が得られた。

実施例 3

CNP トランスジェニックマウスの遺伝子型解析

遺伝子型解析は下記に示す手順に従ってサザンブロット法によって行った。

3 週齢になったマウスの尾（約 15mm）を採取して proteinase K 処理（55℃、100 rpm で 1 昼夜振盪）して溶解液を得た。この溶解液を核酸自動分離装置（KURABO NA-1000）にかけてゲノム DNA を調製した。ゲノム DNA 15 μ g を Pvu II（200 U）で処理してからフェノール・クロロホルム処理によって制限酵素を除いた後にエタノール沈殿で DNA を回収した。回収された DNA を 25 μ L の TE に溶解して 0.7% アガロースゲル電気泳動（50V 定電圧）にかけ、泳動終了後、ゲルを 0.25 M HCl 溶液で 15 分間処理して DNA を切断し、水洗してから 0.4 M NaOH 溶液でナイロンメンブレンに一晩ブロッティングした。その後、メンブレン上の DNA を UV クロスリンク法で固定した。メンブレンをハイブリダイゼーション溶液（50% ホルムアミド、0.5 x Denhardt's, 0.5% SDS、5x SSPE）で処理（42℃、2 時間）してから、CNP の cDNA（約 0.5kb）を鋳型として BcaBEST Labeling Kit（TaKaRa）で調製した 32 P 標識プローブを加えて 42℃で一晩ハイブリダイゼーションした。その後、洗浄溶液（2 x SSC、0.1% SDS）で 55℃、20 分間処理してから Imaging Plate（Fuji Film）に一晩露光し、導入遺伝子のシグナルを BAS2000（Fuji Film）で検出した（図 3）。野生型マウス（WT）では 3 本のシグナル（野生型 CNP 遺伝子）が検出され、トランスジェニックマウス（Tgm）では野生型 CNP 遺伝子に加えて、導入遺伝子由来のシグナル（トランスジーン）が 2 本検出された。

実施例 4

CNP トランスジェニックマウスにおける CNP の発現

CNP 濃度の測定には、CNP-22 EIA 測定キット（PHOENIX PHARMACEUTICALS INC. 社製）を用いた。

7 週齢の雌雄 CNP トランスジェニックマウスおよび雌雄の正常同腹マウス各 3 例をエーテル麻酔下で後大静脈から全採血して安楽死させた。

導入した遺伝子の高発現が予想される臓器である肝臓を採取し、肝重量 0.1 g に対して、上記測定キットの EIA assay バッファー 1 mL を加え氷冷した。ワーリ

ングブレンダー（ヒスコトロン社製）でホモジナイズし、遠心分離（2,000 rpm、5 分間）した上清を CNP-22 濃度測定サンプルとした。

採取した血液に、1 mg のエチレンジアミン 4 酢酸・4 ナトリウム塩（純正化学社製）と 2 トリプシン阻害単位のアプロチニン（Sigma 社製）を添加して攪拌して血漿を分離し、CNP-22 濃度測定サンプルとした。

測定結果を表 1 に示した。

表 1 CNP トランスジェニックマウスにおける CNP の発現

		肝臓 (ng/g 組織)	平均±SD	血漿 (ng/mL)	平均±SD
野生型	No.1	38.8	29.3±20.5	0.3	0.3±0.06
	No.2	5.9		0.4	
	No.3	43.3		0.3	
CNP tgm	No.1	293.3	290±81.7**	10.3	8.0±4.7 [#]
	No.2	370.0		11.1	
	No.3	206.7		2.6	

**： p<0.01（対応のない Student t-test）

#: p<0.05（Wilcoxon 順位和検定）

CNP トランスジェニックマウスは野生型に対する平均値±標準偏差 (mean±SD) の比較では肝臓で約 10 倍、血漿で約 24 倍の CNP-22 濃度を示しており、いずれも統計学的に有意な差であった。これらの結果より、CNP トランスジェニックマウスにおいて、CNP ペプチドが過剰発現されていることが確認された。

実施例 5

CNP トランスジェニックマウスにおける成長曲線

雌雄の CNP トランスジェニックマウスおよびその正常同腹仔の鼻肛長 (naso-anal length, cm) を、2～9 週間にわたり経時的に測定した（図 4）。その結果、雌雄ともに CNP トランスジェニックマウスは鼻肛長が正常同腹仔よりも大きく、身長増加が促進されていることが判明した。また、この結果は、血中の CNP 濃度を上昇させることで身長増加が促進されることも同時に示すものである。

実施例 6

CNP トランスジェニックマウス成長軟骨の組織学的解析

成長軟骨の厚さを組織学的に解析する目的で、9週齢の CNP トランスジェニックマウスおよび同腹の正常マウスの雌5例をエーテル麻酔下で後大静脈から全採血して安楽死させ、大腿骨を20%ホルマリンにより1週間固定した。その後20% EDTA-4Na（純正化学社製）水溶液（pH7.4）に浸漬して脱灰した後、大腿骨膝蓋面を正中矢状断して常法に従いパラフィン包埋し、パラフィンブロックを作製した。厚さ4 μ mの切片をミクロトームを用いて薄切してパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色した。成長軟骨の厚さは、対物レンズ10倍での1視野を画像解析ソフト（IPAP、住化テクノサービス社製）に取り込み、同ソフトを用いて視野中の5点について、休止層、増殖層、肥大層の厚さを計測して平均値を算出し、その個体の各層の厚さとした。また、上記3層の合計値をその個体の成長軟骨の厚さとした。これら項目について、正常同腹仔と CNP トランスジェニックマウスの間で平均値および標準偏差を算出し（Microsoft Excel2000、マイクロソフト社製）、対応のない Student の t 検定によって統計学的解析を行った（SAS ver. 6.12, SAS インスティテュートジャパン社製）。

CNP トランスジェニックマウス（CNP tgm）においては、正常マウス（野生型）に比して休止層（Resting）、増殖層（Proliferating）、肥大層（Hypertrophy）およびその合計（Total）のすべてについて統計学的に有意に成長軟骨層が厚いことが判明した（図5）。これらの結果から、GC-B 活性化物質の1種である CNP は成長軟骨の各層を厚くすることにより、哺乳動物の身長増加を促進することが判明した。

産業上の利用可能性

本発明の、GC-B 活性化物質を有効成分として含む組成物は、FGFR3 異常を有しない個体における内分泌性低身長症、非内分泌性低身長症及び二次性低身長症などの低身長症を治療することを可能にする。この組成物は、成長ホルモンやインシュリン様成長因子-I（IGF-I）の注射や骨切り術などの整形外科手術と比べて患者の負担、苦痛が少なく、患者の QOL に配慮した優れた治療剤となりうる。本発明の組成物はまた、FGFR3 異常を有しない、低身長症患者以外の個体での伸長用途

に用いることができる。本発明はまた GC-B を活性化することにより *in vivo*、*ex vivo* あるいは *in vitro* にて FGFR3 異常を有しない軟骨性骨を伸長させることができる。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

配列表フリーテキスト

配列番号 1 の説明：6-Cys と 22-Cys の間でジスルフィド結合が形成されている。

配列番号 2 の説明：37-Cys と 53-Cys の間でジスルフィド結合が形成されている。

配列番号 3 の人工配列の説明：CNP-22 誘導体(ここで、6-Cys と 22-Cys の間でジスルフィド結合が形成される)。

配列番号 4 の人工配列の説明：CNP-22 誘導体(ここで、6-Cys と 22-Cys の間でジスルフィド結合が形成される)。

配列番号 5 の人工配列の説明：CNP-22 誘導体(ここで、6-Cys と 22-Cys の間でジスルフィド結合が形成される)。

配列番号 6 の人工配列の説明：CNP-22 誘導体(ここで、1-Cys と 17-Cys の間でジスルフィド結合が形成される)。

配列番号 7 の人工配列の説明：CNP-22 誘導体(ここで、7-Cys と 23-Cys の間でジスルフィド結合が形成される)。

配列番号 8 の人工配列の説明：CNP-22 誘導体(ここで、6-Cys と 22-Cys の間でジスルフィド結合が形成される)。

配列番号 9 の人工配列の説明：CNP-22 誘導体(ここで、1-Cys と 17-Cys の間でジスルフィド結合が形成される)。

配列番号 10 の人工配列の説明：CNP-22 誘導体 (ここで、4-Xaa=Leu, Ile, Val; 5-Xaa=Lys, Leu, Met; 6-Xaa=Leu, Ile, Ala, Val; 11-Xaa=Ser, Ala, Gly, Thr, Asn; 12-Xaa=Met, Ala, Trp, His, Lys, Ser, Gly; 14-Xaa=Gly, Lys, Ala, Leu; 15-Xaa=Leu, Met。また、 1-Cys と 17-Cys の間でジスルフィド結合が形成されている。)

請求の範囲

1. グアニルシクラーゼ B (GC-B) 活性化物質を有効成分として含む、FGFR3 異常を有しない個体に投与する身長増加用組成物。
2. 低身長症患者に使用される、請求項 1 に記載の組成物。
3. 低身長症患者以外の個体に使用される、請求項 1 に記載の組成物。
4. 前記身長増加が軟骨性骨の伸長である、請求項 1 に記載の組成物。
5. 前記身長増加が大腿骨、脛骨、橈骨及び/又は尺骨の伸長である、請求項 1 に記載の組成物。
6. 前記物質がペプチドである、請求項 1 に記載の組成物。
7. 前記ペプチドが C 型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) 又はその誘導体である、請求項 6 に記載の組成物。
8. 前記 CNP が、ヒトを含む哺乳類又は鳥類由来の CNP-22 及び CNP-53 から選択される、請求項 7 に記載の組成物。
9. 前記 CNP が配列番号 1 の CNP-22 又は配列番号 2 の CNP-53 である、請求項 7 に記載の組成物。
10. 前記誘導体が、配列番号 1 又は配列番号 2 のアミノ酸配列において 1 ～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加しかつ CNP 活性を有するものである、請求項 7 に記載の組成物。
11. GC-B を活性化することによって、FGFR3 異常を有しない個体の身長を増加することを特徴とする、身長増加方法。
12. 前記身長増加が軟骨性骨の伸長である、請求項 11 に記載の身長増加方法。
13. 前記身長増加が大腿骨、脛骨、橈骨及び/又は尺骨の伸長である、請求項 11 に記載の身長増加方法。
14. 前記 GC-B が、CNP 又はその誘導体によって活性化される、請求項 11 に記載の身長増加方法。
15. 前記 CNP が、ヒトを含む哺乳類又は鳥類由来の CNP-22 又は CNP-53 である、請求項 14 に記載の身長増加方法。

16. 前記 CNP が、配列番号 1 の CNP-22 又は配列番号 2 の CNP-53 である、請求項 14 に記載の身長増加方法。

17. 前記誘導体が、配列番号 1 又は配列番号 2 のアミノ酸配列において 1 ～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加しかつ CNP 活性を有するものである、請求項 14 に記載の身長増加方法。

18. GC-B の活性を指標として身長増加剤の候補薬剤をスクリーニングすることを含む、身長増加剤のスクリーニング方法。

19. GC-B を発現する培養細胞又は関節軟骨細胞由来の細胞を準備し、該細胞を候補薬剤の存在下で培養し、該細胞の GC-B 活性を指標として身長増加剤の候補薬剤をスクリーニングすることを含む、請求項 18 に記載のスクリーニング方法。

20. 前記 GC-B 活性が、細胞内 c GMP 産生量として測定される、請求項 18 に記載のスクリーニング方法。

21. GC-B を強制発現させた培養細胞株を準備し、該細胞株を被験物質の存在下又は非存在下で培養し、該細胞株の細胞内 c GMP の産生量を測定し、該被験物質の存在下と非存在化での細胞内 c GMP 産生量の差を指標として身長増加剤の候補薬剤をスクリーニングすることを含む、請求項 18 に記載のスクリーニング方法。

22. GC-B を活性化することにより FGFR3 異常を有しない軟骨性骨を伸長させる方法。

図 1 A

図 1 B

図 1 C

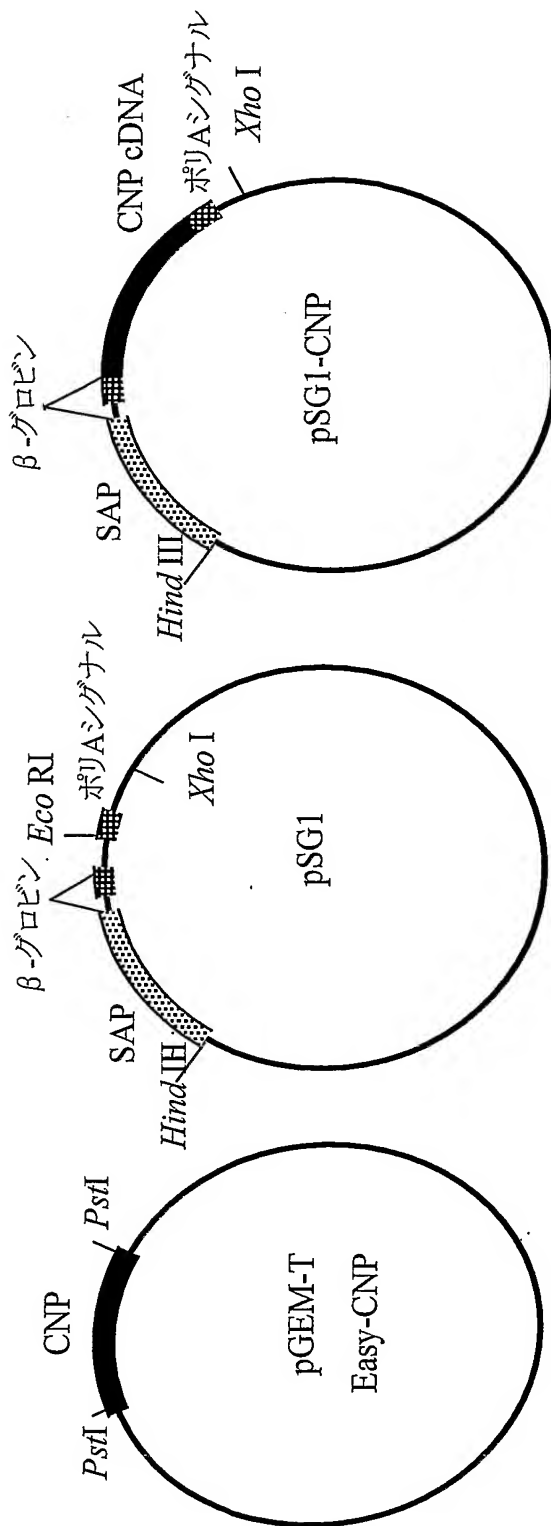


図 2

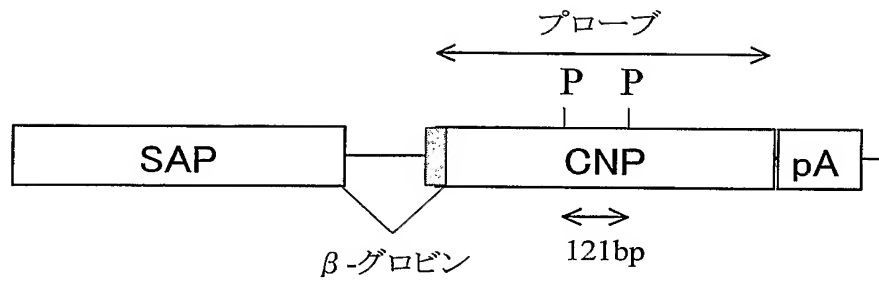


図 3

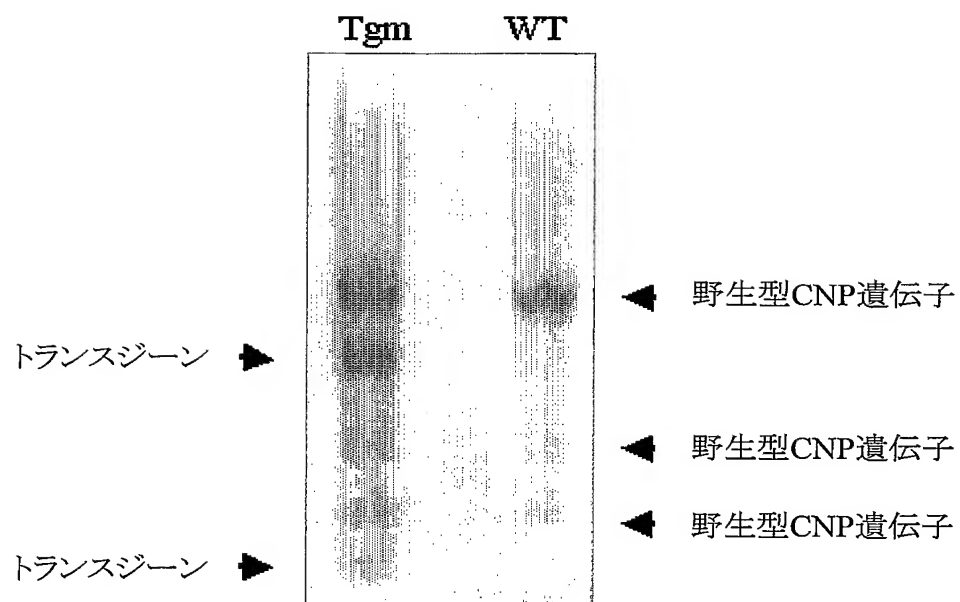


図 4 B

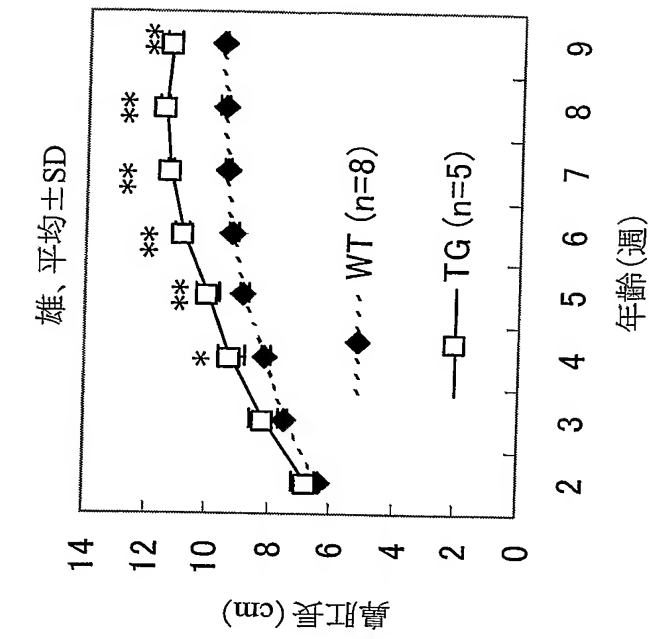


図 4 A

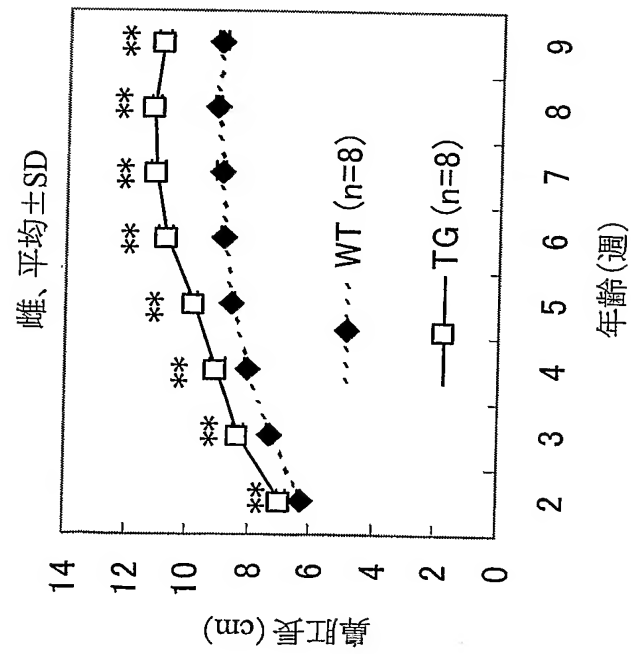
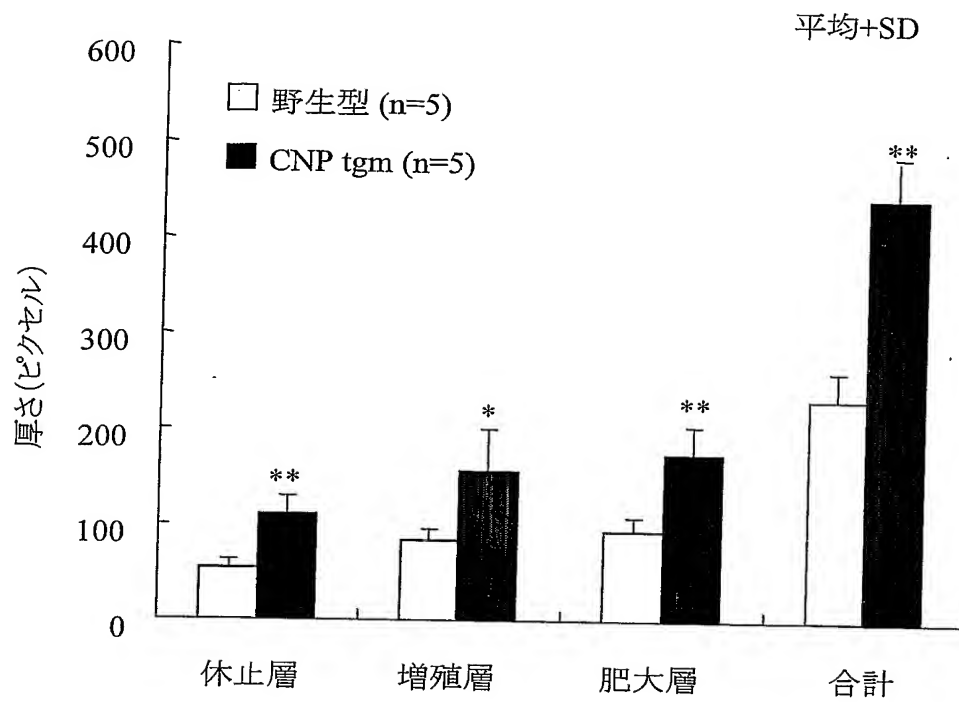


図 5



SEQUENCE LISTING

<110> Nakao, Kazuwa

<120> Agent for increasing body height

<130> PH-2443-PCT

<150> JP 2004-107871

<151> 2004-03-31

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Description: A disulfide bond is formed between 6-Cys and 22-Cys

<400> 1

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1

5

10

15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 2

<211> 53

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Description: A disulfide bond is formed between 37-Cys and 53-Cys

<400> 2

Asp Leu Arg Val Asp Thr Lys Ser Arg Ala Ala Trp Ala Arg Leu Leu

1

5

10

15

Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly

20

25

30

Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met

35

40

45

Ser Gly Leu Gly Cys

50

<210> 3

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: CNP-22

derivative, where a disulfide bond is formed between 6-Cys and 22-Cys

<400> 3

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ala

1

5

10

15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 4

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:CNP-22

derivative, where a disulfide bond is formed between 6-Cys and 22-Cys

<400> 4

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1

5

10

15

Gln Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 5

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:CNP-22

derivative, where a disulfide bond is formed between 6-Cys and 22-Cys

<400> 5

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1

5

10

15

Ala Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:CNP-22

derivative, where a disulfide bond is formed between 1-Cys and 17-Cys

<400> 6

Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly

1

5

10

15

Cys

<210> 7

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:CNP-22

derivative, where a disulfide bond is formed between 7-Cys and 23-Cys

<400> 7

Ser Leu Arg Arg Ser Ser Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly

1

5

10

15

Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 8

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:CNP-22

derivative, where a disulfide bond is formed between 6-Cys and 22-Cys

<400> 8

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys Asn Ser Phe Arg Tyr

20 25

<210> 9

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:CNP-22

derivative, where a disulfide bond is formed between 1-Cys and 17-Cys

<400> 9

Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Gln Ser Gly Leu Gly

1 5 10 15

Cys Asn Ser Phe Arg Tyr

20

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:CNP-22

derivative, where 4-Xaa=Leu, Ile, Val; 5-Xaa=Lys, Leu, Met; 6-Xaa=Leu, Ile, Ala, Val; 11-Xaa=Ser, Ala, Gly, Thr, Asn; 12-Xaa=Met, Ala, Trp, His, Lys, Ser, Gly; 14-Xaa=Gly, Lys, Ala, Leu; 15-Xaa=Leu, Met and where a disulfide bond is formed between 1-Cys and 17-Cys

<400> 10

Cys Phe Gly Xaa Xaa Xaa Asp Arg Ile Gly Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Gly

1

5

10

15

Cys

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/006837

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ A61K45/00, 38/00, 38/22, A61P19/00, 43/00, C12Q1/02, G01N33/15,
33/50//C07K14/47, C12N15/00, 15/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ A61K45/00, 38/00, 38/22, C12Q1/02, G01N33/15, 33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), CAPLUS (STN), EMBASE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2003-113116 A (Kazuo NAKAO), 18 April, 2003 (18.04.03), Full text; particularly, examples 1 to 6; Par. No. [0015], lines 13 to 17; Claims & JP 2003-104908 A & US 6743425 B1	1-10 18-21
X Y	TANAKA, Kiyoshi, Natriuretic peptides as novel growth factor of growth plate cartilage, Clinical Calcium, 2002, Vol.12, No.3, pages 352 to 355	1-10 18-21
X Y	CHUSHO, Hideki et al., Dwarfism and early death in mice lacking C-type natriuretic peptide, Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 2001, Vol.98, No.7, pages 4016 to 4021	1-10 18-21



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

01 June, 2005 (01.06.05)

Date of mailing of the international search report

21 June, 2005 (21.06.05)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/006837

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	YASODA, Akihiro et al., Natriuretic peptide regulation of endochondral ossification, Evidence for possible roles of the C-type natriuretic peptide/guanylyl cyclase-B pathway, Journal of Biological Chemistry, 1998, Vol.273, No.19, pages 11695 to 11700	1-10 18-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/006837

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 11-17, 22
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 11 to 17 and 22 pertain to methods for treatment of the human body by therapy.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ A61K45/00, 38/00, 38/22, A61P19/00, 43/00, C12Q1/02, G01N33/15, 33/50 // C07K14/47, C12N15/00, 15/09

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ A61K45/00, 38/00, 38/22, C12Q1/02, G01N33/15, 33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), CAPLUS (STN), EMBASE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2003-113116 A (中尾一和) 2003.04.18	1-10
Y	全文、特に実施例1~6、段落【0015】の13~17行、特許 請求の範囲参照 &JP 2003-104908 A &US 6743425 B1	18-21

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01.06.2005

国際調査報告の発送日

21.6.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

榎本 佳予子

4 P

9638

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	TANAKA, Kiyoshi, Natriuretic peptides as novel growth factor of growth plate cartilage, Clinical Calcium, 2002, Vol.12, No.3, p.352-355	1-10 18-21
X Y	CHUSHO, Hideki et al., Dwarfism and early death in mice lacking C-type natriuretic peptide, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 2001, Vol.98, No.7, p.4016-4021	1-10 18-21
X Y	YASODA, Akihiro et al., Natriuretic peptide regulation of endochondral ossification, Evidence for possible roles of the C-type natriuretic peptide/guanylyl cyclase-B pathway, Journal of Biological Chemistry, 1998, Vol.273, No.19, p.11695-11700	1-10 18-21

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 11-17, 22 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、

請求の範囲 11-17 及び 22 は治療による人体の処置方法に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。